

选择性捕获禽病原性大肠杆菌体内转录序列

陈 祥^{1,2}, 高 崧^{1*}, 王晓泉^{1,2}, 焦新安^{1,2}, 刘秀梵¹

(¹ 扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 ² 江苏省人兽共患病学重点实验室 扬州 225009)

摘 要 采用选择性捕获转录序列 (SCOTS) 方法鉴定禽病原性大肠杆菌 E037 株 (血清型 O78) 在感染 SPF 鸡过程中的转录表达基因。通过总 RNA 分离、cDNAs 合成、PCR 扩增和 SCOTS 对 cDNAs 选择和致病性特异转录序列的富集, 致病性特异的 cDNAs 被分离鉴定, 共获得 31 个转录序列 (命名为 *aec*) 其中分别有 2、1、4、14、2 和 8 个 *aec* 序列与黏附素、LPS 的合成、铁的摄取系统、质粒编码基因、噬菌体编码基因和一些其它功能基因相关; 从气囊中分离到 16 个 *aec* 序列, 心包膜中分离到 15 个 *aec* 序列; 有 3 种与质粒编码基因相关序列在气囊和心包膜中都被分离到。结果显示 APEC 致病性特异序列包括黏附素、LPS 的合成、铁的转运、质粒编码基因、噬菌体编码基因和一些其它功能基因等。通过 SCOTS 方法建立了一种体内表达致病性特异基因的方法和 APEC 在自然宿主感染模型中致病性相关基因的表达谱的筛选方法。

关键词 : 禽病原性大肠杆菌, 选择性捕获转录序列, O78 血清型, 体内

中图分类号 S852 文献标识码 A 文章编号 0001-6209 (2007) 03-0407-06

禽病原性大肠杆菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 可引起家禽局部或全身性的感染, 包括呼吸道感染 (气囊炎和肺炎)、心包炎、肝周炎和败血症等^[1], 其优势血清型为 O1:K1, O2:K1 和 O78:K80, 与其致病相关的毒力因子已相继报道, 如铁摄取系统、I 型菌毛、P 菌毛、V 型大肠杆菌素等^[1,2]。然而, 关于禽病原性大肠杆菌引起侵入性感染机理还没有阐述清楚, 一些已知的致病因子仅能解释感染过程的某些步骤^[3]。人们在致力弄清 APEC 已知毒力因子的同时, 将注意力转移到新的致病基因的分离与鉴定方面^[4]。

自 1999 年首次报道了选择性捕获转录序列 (Selective capture of transcribed sequences, SCOTS) 方法以来, SCOTS 已经用于捕获结核分枝杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等在感染组织和细胞中的转录序列^[5,6]。由于宿主细胞有大量自身 RNA 的存在, 直接分离细菌在感染宿主中的表达基因是非常困难的, 而 SCOTS 方法在鉴定病原微生物与宿主细胞相互作用的转录基因方面有其优越性, 其主要通过生物素标记的细菌基因组 DNA 与感染细胞或组织中的细菌 cDNAs 杂交, 有选择地捕获细菌 cDNAs。

本文通过接种 SPF 鸡, 使 APEC 毒力相关基因在感染过程中表达, 运用 SCOTS 方法分离 APEC

E037 株致病性相关的 cDNAs。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 : 禽病原性大肠杆菌高致病株 E037 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室分离^[7]; K-12 MG1655 由中国疾病预防控制中心病毒基因工程国家重点实验室金奇教授惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。克隆载体为 pCR[®] 2.1 Vector, 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂 : DNA 限制性内切酶、*Ex Taq*、DNA Fragment Purification Kit、DNA marker 购自大连 TaKaRa 公司; PCR 试剂盒、dNTP、dCTP、AMV、DEPC 购自 Promega 公司; DIG DNA Labeling and Detection Kit、Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization、PEG8000、糖原购自 Roche 公司 (德国); 总 RNA 提取试剂盒购自上海 Sangon 公司; Photobiotin acetate、EPPS 购自 Sigma 公司; 链亲和素的磁珠 (Dynabeads[®] M-280 Streptavidin) Magnet 购自 Dylal 公司 (挪威); 其它常规试剂均为国产分析纯级产品。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取

运用大连 TaKaRa 公司的 MiniBEST Bacterial

基金项目 国家自然科学基金 (30471281) ; 国家杰出青年科学基金 (30425031) ; 国家 863 计划 (2006AA10A206)

* 通讯作者。Tel 86-514-7991448 ; Fax 86-514-7972218 ; E-mail : gsong@yzu.edu.cn

作者简介 陈 祥 (1978 -) 男, 江苏盐城人, 博士, 主要从事病原生物学研究。E-mail : chenxiang@yzu.edu.cn

收稿日期 2006-09-08 ; 接受日期 2006-10-23 ; 修回日期 2006-11-25

Genomic DNA Extraction Kit 提取 E037 株和 K-12 MG1655 株的基因组 DNA。

1.3 大肠杆菌 rDNA 的克隆与大量提取

根据 GenBank 中的 J01695 设计引物, 扩增大肠杆菌 rDNA 基因(含 5S、16S 和 23S 全基因)。引物序列 rm-1 为 5'-CGAAGTTTAATTCCTTGAGCGTC-3' (1487 ~ 1509bp); rm-62 为 5'-TACTCAGGAGAGCGTTCACCGAC-3' (6672 ~ 6694bp), 采用 50 μ L 体系, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 40s, 52 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 300s, 共进行 25 个循环。PCR 产物纯化后与 pCR[®] 2.1 Vector 进行连接, 获得大肠杆菌 rDNA 的克隆 pCR2.1-rm, 将阳性克隆进行双酶切鉴定和 DNA 测序(上海联合基因科技有限公司)。rDNA 克隆 pCR2.1-rm 按碱裂解法提取质粒和 PEG 沉淀法纯化质粒 DNA^[8,9]。

1.4 RNA 分离、cDNAs 合成、PCR 扩增

SPF 鸡由山东家禽所 SPF 种蛋自行孵化, 6 只 3 周龄 SPF 鸡, 右胸气囊接种 APEC E037 株 0.1mL (约 10⁷ CFU/mL); 在接种后 6h 和 24h 分别扑杀 SPF 鸡, 每次扑杀 3 只, 分别取其心包膜和左气囊, 称重后快速剪成匀浆, 运用 TRIzol 试剂盒分别从心包和气囊中分离总 RNA, 每份组织样品单独提取 RNA。运用核酸蛋白检测仪测定所提取的 RNA 的浓度与纯度, 1% 琼脂糖甲醛变性胶鉴定总 RNA 完整性^[8,9]。样品分为心包组和气囊组, 每个样品通过随机引物单独转化为单链 cDNAs (RNA 到 cDNA), 其中气囊组的随机引物为 airscas-dN9: 5'-CGGGATCCAGCTTCTGACGCANNNNNNNNN-3'; 心包组的随机引物为 pericardium-dN9: 5'-GTGGTACCGCTCTCCGTCCGANNNNNNNNNN-3'。运用 Klenow 大片段合成第二链, 双链 cDNAs 纯化后直接用于 PCR 扩增或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。其中气囊和心包的 PCR 扩增引物分别为: airscas 是 5'-CGGGATCCAGCTTCTGACGCA-3'; pericardium 是 5'-GTGGTACCGCTCTCCGTCCGA-3'。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 扩增 25 循环^[4,15]。

1.5 SCOTS

1.5.1 基因组 DNA 的生物素标记和超声波处理: Photobiotin Acetate 用超纯水稀释至终浓度为 1 μ g/ μ L。20 μ L 整数倍的 E037 基因组 DNA (浓度为 0.6 μ g/ μ L) 按文献^[4,15]的方法进行光敏化。生物素标记基因组 DNA (6 μ g) 中加入 100 μ g pCR2.1-rm 质粒 DNA (rDNA 克隆于 pCR-2.1 载体中), 混和物用超声波仪最大功率的 40% 进行裂解 (SANYO, JAP), 每个样品裂解 3 次, 每次 10s。裂解后, 混和物被沉淀, 用

160 μ L 的 10mmol/L EPPS-1mmol/L EDTA 溶液进行悬浮, 混合物分装为 20 份, 每份 8 μ L (0.3 μ g 的 E037 株生物素标记的基因组 DNA 和 5 μ g 的 pCR2.1-rm 质粒 DNA), -20 $^{\circ}$ C 保存。K-12 MG1655 的基因组 DNA (200 μ g) 溶于 400 μ L 超纯水中, 依上述方法进行超声波裂解、沉淀、悬浮和分装, 每份 8 μ L (10 μ g 的 K-12 MG1655 基因组 DNA), -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5.2 样品预杂交: 每份 8 μ L 超声波处理的混合物加矿物油覆盖, 在 98 $^{\circ}$ C 作用 3min, 加 2 μ L 的 1mol/L NaCl, 在 67 $^{\circ}$ C 预杂交 30min。扩增感染组织的细胞和细菌的 cDNAs (3 μ g) 用 8 μ L 的 10mmol/L EPPS-1mmol/L EDTA 溶液进行悬浮, 沸水浴作用 3min, 加上 2 μ L 的 1mol/L NaCl, 在 67 $^{\circ}$ C 预杂交 30min 后, 加入到生物素标记基因组 DNA-rDNA 中, 总体积 20 μ L, 在 67 $^{\circ}$ C 作用 18h。细菌的 cDNAs 就杂交到生物素标记的基因组 DNA 上, 形成细菌的 cDNAs-基因组 DNA 杂合子。

1.5.3 转录序列的捕获: 链亲和素磁珠的处理按其说明书进行。在 100 μ g 包被有链亲和素磁珠的悬浮溶液中加入 cDNAs-基因组 DNA 杂合子混合物 (20 μ L), 室温作用 20min, 来捕获细菌的 cDNAs-基因组 DNA 杂合子, 用 20mmol/L NaCl-0.5% SDS 洗涤磁珠 3 次, 第一次室温洗涤, 第二、三次 65 $^{\circ}$ C 洗涤, 每次 15 ~ 20min。用 100 μ L 的 0.25mol/L NaOH-0.1mol/L NaCl 溶液悬浮磁珠, 37 $^{\circ}$ C 作用 30min, 加入 20 μ L 的 1mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 中和, 在上述溶液中加入 10 μ L 的 1 μ g/ μ L 糖原, 用 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA。在第一次 SCOTS 中, 同时做 6 个平行的杂交和 airscas/pericardium 引物的 PCR 扩增, 沉淀, 用 10mmol/L EPPS-1mmol/L EDTA 溶液进行悬浮, 把 6 个心包样品的 PCR 产物和 6 个气囊样品的 PCR 产物进行混合, 取 3 μ g 的 DNA 与被 rDNA 封闭的 E037 株生物素标记的基因组 DNA 杂交, 按上述同样方法再进行两次 SCOTS。感染组织的 cDNAs 与生物素标记的细菌 DNA 基因组杂交, 形成带生物素标记的 DNA-cDNAs 的杂合子。

1.6 致病性特异的细菌 cDNAs 富集

为了进一步富集细菌 cDNAs 中的致病性特异序列, 生物素标记、超声波处理的 E037 株基因组 DNA 片段 0.3 μ g, 与过量变性的超声波裂解的 K-12 MG1655 基因组 DNA (10 μ g) 和 rDNA 片段 5 μ g 在 67 $^{\circ}$ C 进行预杂交 30min, 变性的 SCOTS 获得的 cDNAs (1.5 μ g) 在 67 $^{\circ}$ C 预变性 30min 后, 与上面的 DNA 混合, 在 67 $^{\circ}$ C 杂交 8h, rDNA 被磁珠捕获, 洗涤, 用

airscas/ pericardium 引物 PCR 扩增。变性的 1.5 μ g 扩增 cDNAs 按上述相同方法再富集 2 次。通过 3 次阳性富集 ,富集的 cDNAs 与 pCR[®] 2.1 载体进行 TA 克隆 ,对阳性克隆进行质粒提取和 airscas/ pericardium 引物 PCR 扩增^[8 9]。

1.7 斑点杂交筛选阳性克隆

分别对 E037 和 K-12 MG1655 基因组 DNA 的超声波裂解产物 (2 μ g)进行地高辛标记 ,调整二者探针浓度一致 ,将经捕获的 cDNAs 克隆子的质粒 PCR 扩增产物进行斑点杂交以鉴定捕获序列的特异性 ,操作步骤按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书进行。

1.8 DNA 测序

根据 Dot-blot 得到的阳性结果 ,将阳性克隆重组质粒纯化 ,DNA 测序工作由上海联合基因科技有限公司完成。DNA 同源比较通过 NCBI 中的 BLASTN 进行检索。

2 结果

2.1 细菌基因组 DNA 的定量

运用大连 TaKaRa 公司 MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit 提取细菌基因组 ,其中 E037 株 DNA 为： $OD_{260}/OD_{280} = 1.81$,浓度为 80ng/ μ L ;K-12 MG1655 株 DNA 为： $OD_{260}/OD_{280} = 1.82$,浓度为 85ng/ μ L ,样品的 OD_{260}/OD_{280} 位于 1.8 ~ 2.0 间 ,表明所提取的基因组中蛋白质和 RNA 污染较少 ,纯度较高。

2.2 大肠杆菌 rDNA 基因的克隆与鉴定

rDNA 的 PCR 产物在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳 ,扩增的片段约为 5200bp ,与预计长度一致 (图 1) ,PCR 回收产物与 pCR[®] 2.1 Vector 连接获得的重组质粒 pCR2.1-rm ,经 *Bam*HI 和 *Eco*RV 双酶切 ,琼脂糖电泳中出现约 3900bp 和 5200bp 的条带 (图 2) ,重组质粒 pCR2.1-rm 经序列测定 ,与大肠杆菌 rRNA 操纵子 (J01695)的同源性为 99%。

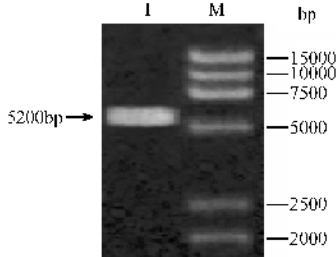


图 1 E037 rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig.1 The amplified products of rDNA gene by PCR. 1. The amplified fragment of rDNA gene ; M. DL2000 + 15000 marker.

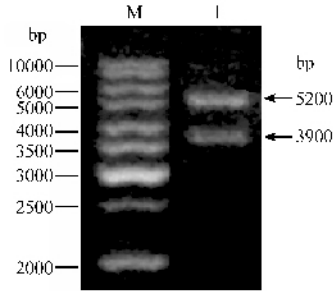


图 2 质粒 pCR2.1-rm 的酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of pCR2.1-rm by digestion with restriction endonucleases. M. Generuler 1kb DNA ladder marker ;I. pCR2.1-rm digested with *Bam*HI and *Eco*RV.

2.3 APEC E037 株接种鸡的 SCOTS 结果

为了获取 APEC 致病性特异的转录序列 ,尽量减少大肠杆菌 K-12 的序列 ,进行 3 次 SCOTS 和 3 次富集 ,获得的 cDNAs 被克隆 ,通过斑点杂交共获得 31 个 E037 阳性的转录序列 (命名为 *aec*) ,其中从气囊中分离到 16 个 *aec* 序列 ,心包膜中分离到 15 个 *aec* 序列 ;有 3 种与质粒编码基因相关序列在气囊和心包膜中都被分离到 ;在这 31 个转录序列中 ,有 6 个转录序列与肠炎沙门氏菌同源性较高 ,4 个转录序列与福氏志贺氏菌基因有较高同源性 ,2 个转录序列与宋内志贺氏菌同源性较高 ,2 个转录序列与尿道致病性大肠杆菌基因组同源性较高 ,2 个转录序列与肠出血性大肠杆菌基因组同源性较高 ,分别有 1 个转录序列与耶尔森菌、莫拉氏杆菌和结核分支杆菌基因组同源性较高 (表 1)。

在这 31 个致病性特异序列中 ,有 2 个 *aec* 序列与黏附素相关 ,1 个 *aec* 序列与 LPS 的合成相关 ,4 个 *aec* 序列与铁的摄取系统相关 ,14 个 *aec* 序列与质粒编码基因相关 ,2 个 *aec* 序列与噬菌体编码基因相关 ,8 个 *aec* 序列与一些其它功能基因相关。这些序列包括了黏附素、LPS 的合成、铁的转运、质粒编码基因、噬菌体编码基因和一些其它功能基因。

3 讨论

APEC 的致病性是一个多因子相互作用的结果 ,其引起侵入性感染的机理还不清楚。分离与鉴定细菌在感染过程中的表达基因 ,它们往往与细菌的感染机理密切相关 ,这些转录基因可为预防和控制禽大肠杆菌病提供重要信息。

SCOTS 方法在鉴定病原微生物与宿主细胞相互作用的转录基因方面有其优越性 ,其基本原理为生物素标记、链亲和蛋白结合排除法 ,它是用生物素来标记驱动方 DNA ,试验方 rRNA 反转录为单链 (或

表 1 SCOTS 捕获的 APEC 致病性特异的转录序列

Table 1 Avian *E. coli* pathogen-specific *aec* clones identified by SCOTS

Functional group	Homolog , source	Accession no. of <i>aec</i> homolog	Function	Tissue
Adherence				
<i>aec</i> -1	<i>piliN</i> , R721	AP002527	R721 plus assembly	A
<i>aec</i> -2	<i>tsh</i> , pAPEC-1	AF218073	Hemagglutinin	A
LPS synthesis				
<i>aec</i> -3	<i>waaO</i> , <i>E. coli</i> F470	AF019746	LPS core biosynthesis	A
Iron-responsive				
<i>aec</i> -4	<i>iutA</i> , ColV	X05874	Aerobactin	P
<i>aec</i> -5	<i>iucA</i> , ColV	X76100	Aerobactin synthesis	P
<i>aec</i> -6	<i>iroC</i> , <i>E. coli</i> 536	X16664	Putative ABC transporter	A
<i>aec</i> -7	YPO3000 , <i>Y. pestis</i>	CAC92244	Putative ABC transporter	A
Plasmid function				
<i>aec</i> -8 to <i>aec</i> -10	ColE2-type plasmids	D30057	Replication , relaxation	A/P
<i>aec</i> -11 ,12	ColE4 , <i>Shigella sonnei</i>	D30059	Replication , relaxation	A/P
<i>aec</i> -13	<i>mobA</i> , O157:H7	Y14016	Rep protein	P
<i>aec</i> -14 to <i>aec</i> -17	<i>mobA</i> , low molecular weight plasmid I , <i>S. enteritidis</i>	AF218051	Enables conjugational Transfer of the plasmid	A/ P
<i>aec</i> -18	<i>traV</i> , <i>S. typhi</i>	AB027308	Nucleotide-binding protein	P
<i>aec</i> -19	<i>traT</i> , pO157	U01159	Exclusion ,serum resistance	A
<i>aec</i> -20 ,21	<i>rom</i> , <i>S. typhi</i>	AY333433	Putative RNAI modulator protein	P
Phage-related				
<i>aec</i> -22	<i>hkbV</i> , HK620	AF335538	DNA stabilization	A
<i>aec</i> -23	Int , P2	P36932	Integrase	P
Other				
<i>aec</i> -24	<i>accC</i> , <i>S. flexneri</i>	AE005674	Acetyl CoA carboxylase	P
<i>aec</i> -25	<i>proP</i> , <i>S. flexneri</i>	AE005674	Proline permease II	P
<i>aec</i> -26	<i>valS</i> , <i>S. flexneri</i>	AE005674	Valine tRNA synthetase	P
<i>aec</i> -27	Unknown , <i>S. flexneri</i>	AE005674	Putative transport protein	A
<i>aec</i> -28	Unknown , CFT073	AE016769	Putative conserved protein	A
<i>aec</i> -29	Unknown , <i>M. tuberculosis</i>	AE000516	Probable membrane protein	A
<i>aec</i> -30	<i>arcA</i> , <i>E. coli</i>	AJ875436	Negative response regulator	A
<i>aec</i> -31	IS1 , <i>M. catarrhalis</i>	X58999	IS1 Target sit	P

A : airsacs ;P : pericardium.

双链 cDNAs 后与驱动方杂交 混合物与链亲和素蛋白珠子作用 链亲和素与生物素结合形成链亲和素-生物素-DNA-cDNAs 的复合物,抽提该复合物,PCR 扩增.生物素标记核酸技术是该方法的关键,为了提高标记效率,采用光激活生物素 (Photoactive Biotin)来代替 dUTP-生物素标记核酸,在强光照射条件下光敏生物素中的 N₃ 基团释放出 N₂ 气,生成反应活性极高的氮烯,它易与核酸中的伯胺基结合而形成共价标记,这样标记效率可大大提高.

1998 ~ 2006 年从我国江苏等 20 个省、自治区病、死家禽中分离到大肠杆菌 1351 株,除 236 株未能定型、28 株自凝外,测定出 1087 个分离株的血清型,这些分离株覆盖了 101 个血清型,其中 O78 血清型有 271 株,占定型菌株的 24.9%,为我国禽源大

肠杆菌最优势血清型. E037 为我们分离的 O78 血清型中的代表性菌株,其对 1 日龄 SPF 鸡的致死率为 83.3% (5/6)[△]. 本文通过 SCOTS 从 APEC E037 株共获得 31 个差异片段,经同源序列分析,这些转录序列可分为 6 组,第 1 组主要为黏附素基因相关转录序列, *aec*-2 转录序列与温度敏感性血凝素 (Tsh)相关, Tsh 首先发现于 O78 APEC 菌株 χ 7122 中^[10]. 其可能与 APEC 的铁摄取能力相关,也可能起着黏附作用^[10].

第 2 组主要为黏附素基因相关转录序列, *aec*-3 转录序列与 LPS 合成基因相关, LPS 对致病性大肠杆菌是非常重要的,与细菌的毒力密切相关,它可以抑制吞噬作用以及补体结合途径^[11]. O78 脂多糖不仅是 APEC 的重要保护性抗原,而且是一种主要的

[△]陈祥.禽病原性大肠杆菌的生物学特性及其可能毒力相关基因的鉴定.扬州大学博士学位论文,2006

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

毒力因子。

第3组主要为铁摄取系统相关转录序列,许多种细菌都具备从宿主获取铁的能力,这一能力的大小亦决定着细菌的致病性,*aec-4*和*aec-5*转录序列与气杆菌素相关,气杆菌素被认为在APEC的致病性和持续感染中,特别是在深部组织损伤中发挥独立的作用^[4]; *aec-4*和*aec-5*转录序列与铁系统相关,铁系统有两个相向的操纵子,*iroN*和*roBCDE*。铁系统可能编码铁结合性复合物的受体,其在持续感染和深部组织损伤中发挥着非常重要的作用^[4]。

第4组主要为质粒相关转录序列,*aec-14*、*aec-15*、*aec-16*和*aec-17*转录序列与肠炎沙门氏菌低分子量质粒I同源性较高,低分子量质粒I可使肠炎沙门氏菌抵抗噬菌体的感染^[12];血清耐受是APEC致病机理之一,血清耐受与致病力相关,*aec-18*、*aec-19*为*traV*、*traT*的基因,*traT*基因调控APEC的血清抗性,*TraT*存在于细菌的外膜蛋白,使血浆中补体和其它杀菌因子不能直接作用于菌体,使细菌表现出血清抗性,*TraT*蛋白可增强细菌对血清中补体裂解活性的抗性,从而使细菌的侵袭力加强,*TraT*与菌体的补体抗性和致病力关系密切,使血浆中补体和其它杀菌因子不能直接作用于菌体,使细菌表现出补体抗性。APEC的毒力因子pColV可使细菌显著增加其在宿主组织中摄取铁的能力,使APEC的致病性增加。产生Colicin V的菌株存在ColV质粒,该质粒可显著提高细菌的毒力^[13]。ColV⁺菌株致病力比ColV⁻菌株强,而且具有补体抗性和特殊的铁摄入机制,从败血型(或原发性大肠杆菌病)病例分离出的菌株,有较大的比例含ColV质粒。

第5组主要为噬菌体相关序列,如*aec-22*、*aec-23*为噬菌体的基因成分,细菌噬菌体相关基因可能编码许多毒力因子(比如毒素和黏附素),有研究表明在质粒、毒力岛与噬菌体之间存在着进化的连续性^[14]。但在APEC E037菌株中,噬菌体是否编码相应的毒力因子还需进一步鉴定。第6组主要为其它功能相关转录序列。

有趣的是通过SCOTS、SSH方法^[7,11],E037株同时获得了MobA、Rom、pColE等相关基因。MobA能够增强质粒的接合性转移能力(plasmid mobilization),Rom为RNAI调节蛋白(RNAI modulator protein),pColE质粒较小(5~11kb),高拷贝(每个细胞10~20拷贝),高拷贝水平的ColE相关质粒可导致相应毒力基因的高水平转录^[4],如*aec-8*、*aec-9*、*aec-10*、*aec-11*和*aec-12*。

通过SCOTS方法获得的基因只有一小部分被克隆,我们的研究仅仅提供了大肠杆菌在感染过程中的部分转录基因,而且主要为在宿主体内表达的致病性相关基因。鉴定在体内表达的致病性特异转录序列可以丰富我们对APEC在宿主感染过程的了解,进一步明确APEC的致病机理。

参 考 文 献

- [1] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*, 1999, **30**(2-3): 299–316.
- [2] Dozois CM, Dho-Moulin M, Bree A, et al. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun*, 2000, **68**(7): 4145–4154.
- [3] Dozois CM, Curtiss R III. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet Res*, 1999, **30**(2-3), 157–179.
- [4] Dozois CM, Daigle F, Curtiss R III. Identification of pathogen specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(1): 247–252.
- [5] Graham JE, Clark-Curtiss JE. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 11554–11559.
- [6] Daigle F, Graham JE, Curtiss R III. Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Mol Microbiol*, 2001, **41**(5): 1211–1222.
- [7] 陈 祥,赵 娟,高 崧,等.抑制差减杂交筛选禽致病性大肠杆菌基因组差异片段及其分析. *微生物学报*, 2005, **45**(5): 680–684.
- [8] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1998
- [9] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- [10] Provence DL, Curtiss R III. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun*, 1994, **62**: 1369–1380.
- [11] Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol*, 1988, **42**: 201–230.
- [12] Rychlik I, Sebkova A, Gregorova D, et al. Low-molecular-weight plasmid of *Salmonella enterica* serovar enteritidis codes for retron reverse transcriptase and influences phage resistance. *J Bacteriol*, 2001, **183**(9): 2852–2858.
- [13] Smith HW, Huggins MB. Further observations on the association of the colicin V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. *J Gen Microbiol*, 1976, **92**: 335–350.
- [14] Katz ME, Wright CL, Gartside TS, et al. Genetic organization of the duplicated *vap* region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *J*

Identification of APEC genes expressed *in vivo* by selective capture of transcribed sequences

CHEN Xiang^{1,2}, GAO Song^{1*}, WANG Xiao-quan^{1,2}, JIAO Xin-an^{1,2}, LIU Xiu-fan^{1*}

(¹ Animal Infectious Disease Laboratory, Ministry of Agriculture, ² Jiangsu Key Laboratory of Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract : Direct screening of bacterial genes expressed during infection in the host is limited, because isolation of bacterial transcripts from host tissues necessitates separation from the abundance of host RNA. Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) allows the selective capture of bacterial cDNA derived from infected tissues using hybridization to biotinylated bacterial genomic DNA. Avian pathogenic *E. coli* strain E037 (serogroup O78) was used in a chicken infection model to identify bacterial genes that are expressed in infected tissues. Three-week-old white leghorn specific-pathogen-free chickens were inoculated into the right thoracic air sac with a 0.1 mL suspension containing 10⁷ CFU of APEC strain E037. Total RNA was isolated from infected tissues (pericardium and air sacs) 6 or 24 h postinfection and converted to cDNAs. By using the cDNA selection method of selective capture of transcribed sequences and enrichment for the isolation of pathogen-specific (non-pathogenic *E. coli* K-12 strain) transcripts, pathogen-specific cDNAs were identified. Randomly chosen cDNA clones derived from transcripts in the air sacs or pericardium were selected and sequenced. The clones, termed *aec*, contained numerous APEC-specific sequences. Among the distinct 31 *aec* clones, pathogen-specific clones contained sequences homologous to known and novel putative bacterial virulence gene products involved in adherence, iron transport, lipopolysaccharide (LPS) synthesis, plasmid replication and conjugation, putative phage encoded products, and gene products of unknown function. Overall, the current study provided a means to identify novel pathogen-specific genes expressed *in vivo* and insight regarding the global gene expression of a pathogenic *E. coli* strain in a natural animal host during the infectious process.

Keywords : avian pathogenic *Escherichia coli*; selective capture of transcribed sequences; O78; *in vivo*

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30471281); National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30425031); Chinese National Programs for High Technology and Development (2006AA10A206)

* Corresponding author. Tel 86-514-7991448; Fax 86-514-7972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received 8 September 2006/Accepted 23 October 2006/Revised 25 November 2006